

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-140097

(43)Date of publication of application : 25.05.1999

(51)Int.Cl.

C07K 14/00
A61K 47/30
B01J 13/00
G01N 33/531
G01N 33/543
G01N 33/543
G01N 33/553
// C07K103:00

(21)Application number : 10-206217

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22)Date of filing : 22.07.1998

(72)Inventor : NICHTL ALFONS DR.

(30)Priority

Priority number : 97 19731469 Priority date : 22.07.1997 Priority country : DE

(54) GOLD CONJUGATE CONTAINING SURFACTANT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a composition useful in e.g. immunoassay and containing colloid particles with biomolecule adsorbed onto the surface, by adding a surfactant to a biomolecule solution when this solution is to be loaded on the colloid particles.

SOLUTION: This composition is obtained by adding a surfactant (e.g. ethoxylate surfactant) so as to be 0.0001-1 mM in concentration to colloid particles before loading the colloid particles with biomolecule such as protein, glycoprotein, peptide, nucleic acid, peptide nucleic acid, saccharide, antigen and/or hapten, and/or by adding the surfactant to a solution containing the biomolecule before and/or during loading the colloid particles with the solution containing the biomolecule. This composition contains a conjugate consisting of the colloid particles such as noble metal particles with the biomolecule adsorbed onto the surface, also containing the surfactant, and being useful as e.g. a detective reagent using immunological detection method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.02.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-140097

(43)公開日 平成11年(1999)5月25日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 07 K 14/00		C 07 K 14/00
A 61 K 47/30		A 61 K 47/30
B 01 J 13/00		B 01 J 13/00
G 01 N 33/531		G 01 N 33/531
33/543	501	33/543 501 K

審査請求 未請求 請求項の数11 O.L (全8頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平10-206217	(71)出願人	594057093 ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー
(22)出願日	平成10年(1998)7月22日		ドイツ連邦共和国 68305 マンハイム-ワルドホフ, サンドホファー シュトラーセ 112-132
(31)優先権主張番号	19731469:4	(72)発明者	アルフォンス ニヒトル ドイツ連邦共和国 ディー-82383 ホーエンハイゼンベルグ, ツヴァイクシュストラーセ 1 b
(32)優先日	1997年7月22日		(74)代理人
(33)優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 界面活性剤を含有する金コンジュゲート

(57)【要約】

【課題】 コロイド粒子と生体分子とのコンジュゲートを安定な形態で提供する。

【解決手段】 表面に生体分子を吸着させたコロイド粒子を含有する組成物であって、界面活性剤をさらに含有する該組成物；該組成物の製造方法；検出試薬としての該組成物の使用；コロイド粒子および生体分子より構成されるコンジュゲートを安定化させる方法；および、上記組成物を検出試薬として含む、免疫学的検出法のための試験キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子表面に生体分子を吸着させたコロイド粒子を含有する組成物であって、界面活性剤をさらに含有することを特徴とする前記組成物。

【請求項2】 前記界面活性剤がエトキシレート界面活性剤であることを特徴とする請求項1記載の組成物。

【請求項3】 界面活性剤を0.0001～1 mMの濃度で含有することを特徴とする請求項1または2記載の組成物。

【請求項4】 前記粒子が貴金属粒子であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】 前記コロイド粒子の平均直径が1 nm～100 nmの範囲であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】 前記生体分子が、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド核酸、サッカリド、抗原およびハプテンからなる群から選ばれることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物の製造方法であって、生体分子をローディングする前にコロイド粒子へ界面活性剤を添加するか、および／または生体分子を含む溶液をコロイド粒子にローディングする前および／または途中に該生体分子を含む溶液へ界面活性剤を添加することを特徴とする前記方法。

【請求項8】 検出試薬としての、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項9】 コロイド粒子と生体分子とから構成されるコンジュゲートを安定化させる方法であって、生体分子をローディングする前にコロイド粒子へ界面活性剤を添加するか、および／または生体分子を含む溶液をコロイド粒子にローディングする前および／または途中に該生体分子を含む溶液へ界面活性剤を添加することを特徴とする前記方法。

【請求項10】 コンジュゲート形成の完了後に追加の安定化剤を添加することを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 免疫学的検出法のための試験キットであって、請求項1～6のいずれか一項に記載の安定化された組成物を検出試薬として含むことを特徴とする前記キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面に生体分子を吸着させたコロイド粒子を含有する組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】タンパク質または核酸等の生体分子とコロイド粒子とのコンジュゲートは、例えば、シグナル伝達物質として、および／または診断法および治療法における捕獲試薬として、広く使用されている。これらは、例えば免疫検定法等の検出手法におけるマーカーとしてまたは遺伝子導入用のマイクロプロジェクトイル(micro

projectile)として作用する。使用可能な粒子は、金属および金属化合物(例えば、金属酸化物、金属水酸化物、金属塩)の粒子、並びに金属または金属化合物で被覆したポリマーコアである[例えば、US-A-4,313,734; Leuveringら, J. Immunoassay 1 (1980), 77-91; Leuvering Dissertation (1984), Sol Particle Immunoassay (SPIA): The use of Antibody Coated Particles as Labelled Antibodies in Various Types of Immunoassay; Udaら, Anal. Biochem. 218 (1994), 259-264, DE-OS 41 32 133, 3頁16～18行(マーカーとしての用途について)及びTangら, Nature 356 (1992), 152-154; Eisenbraunら, DNA and Cell Biology 12 (1993), 791-797; Williamsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2730(遺伝子導入用途について)参照]。さらに、炭素粒子等の非金属性コロイド粒子が使用できることも公知である[van Amerongen, Anabiotic '92 (1993), 193-199]。現在、コロイド金粒子が最も頻繁に用いられている。

【0003】生体分子-金コンジュゲートを製造するには、まず、テトラクロロ金(III)酸を還元することにより常法にて金ゾルを調製する。次いで、各場合に望まれる生体分子(例えば、抗体、プロテインA、プロテインG、ストレプトアビシン等のタンパク質)を金ゾルにローディング(負荷)する。各々のローディング条件(pH、緩衝液、生体分子の濃度等)は、生体分子の等電点、MPA(minimal protecting amount: 最小保護量)および／またはコンジュゲートの特定用途により決まる[例えば、De Mey, The Preparation and Use of Gold Probes: Immunocytochemistry, J. M. PolakおよびS.V. Noorden発行, 115～145頁, Wright, Bristol 1986; J. E. Beesley, Colloidal Gold: A New Perspective for Cytochemical Marking, Microscopy Handbooks 17, Oxford University Press, 1989, 特に1～14頁; G. Frens, Nature Physical Science, 241 (1973) 20-22; J. Roth, The Colloidal Gold Marker System for Light and Electron Microscopic Cytochemistry: Immunocytochemistry 2 (1983) 218-284参照]。詳しくは、これらの文献の記載を参照されたい。

【0004】コロイド粒子に各々所望の生体分子をローディングした後で、コンジュゲートを安定化させる必要がある。この安定化は、粒子の凝集を減少させ、吸着を受け易い残りのフリー表面(free surfaces)を飽和させることを意図している。現段階の技術で使用されている安定化剤は、例えばウシ血清アルブミン、代用血液混合物等の不活性なタンパク質、ポリエチレンジリコール(分子量20,000D)、ポリビニルピロドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルスルフェート、デキストランおよびゼラチン等の水溶解性テクニカル・ポリマーである[例えば、De Mey, 前掲; Beesley, 前掲; Behnke, Eur. J. Cell Biol. 41 (1986), 326-338; DE 24 20 531

C3; およびMeiselら, J. Phys. Chem. 85 (1981), 179-187参照]。さらに、ホスファン(phosphane)錯体配位子による金ゾルの安定化の可能性も記載されている [Schmidら, Z. Naturforsch. 45b (1994), 989-994]。

【0005】コロイド金粒子にローディングする際の手順としては、通常、金へ吸着させるタンパク質の溶液並びに金ゾルを該タンパク質の等電点(IP)付近のpHへ調整する。この点については、現段階の技術では、タンパク質溶液が可能ならば添加剤を含んではならず、例えばイオン強度が10mMを超えてはならないことが、良好なローディングを行なうのに必須であると認められている。ローディングを行なう場合、攪拌下でタンパク質溶液を金ゾルへ添加するか、または攪拌下で金ゾルをタンパク質溶液へ添加する。タンパク質が金粒子に結合した後、適切な安定化剤の溶液を添加する。次いで、場合によっては、形成したコンジュゲートを、例えば超遠心分離またはゲル汎過によって精製する。

【0006】現段階の技術に従って使用される安定化剤は、金属粒子のフリー表面に吸着結合する。長期保存や、試料(血液、血清、血漿、尿)との接触による試験時に発生するような周囲条件の変化、試験片(ストリップ)フリースへのコンジュゲートの取り込み等により、安定化剤が多少なりとも該表面から脱離したり置き換わったりすることがある。これは、凝集安定性の低下を招き、非特異的反応性の増加を招く。さらに、使用される安定化剤の大部分は、場合によっては品質が変化しやすい、特性のはつきりしない生成物である(例えば、ウシ血清アルブミン、ゼラチン)。このことは、安定化効果を変動させる原因でもある。

【0007】粒子表面での吸着過程は非常に複雑であり、現在まで、ごく一部しか解明されていない。吸着は静電的相互作用、ファンデルワールス力および疎水的相互作用の組み合わせによるものと考えられる(Beesley, 前掲)。この方法では、吸着した生体分子の種類に応じて、あるタイプまたは他のタイプの結合が優勢となり得る。

【0008】凝集体は、公知の技術によるタンパク質-金コンジュゲートではある程度生成するものである。これらの望ましくない凝集体は、安定化剤を添加する前に、既に高い頻度で生成している。凝集体が生成する理由は、例えば、「粘着性」のタンパク質(即ち、疎水性表面を有するタンパク質)が互いに結合し、その結果、該タンパク質とコンジュゲートを形成している金粒子が架橋されるためと考えられる。従って、例えば、金へ結合させる前に超遠心分離によってIgG調製物から凝集体を除かなければならぬことが記載されている[W. D. Geoghegan, G. A. Ackerman, J. Histochem. Cytochem. 25 (1977), 1187-1200]。さらに、タンパク質によって被覆されていない貴金属粒子(特に金粒子)表面の疎水性パッチが互いに相互作用し、粒子凝集体を形成し得る

可能性がある。望ましくない凝集体が生成するもう1つの原因としては、タンパク質によって被覆されていない貴金属表面の疎水性パッチが、近隣の金粒子に結合しているタンパク質の疎水性パッチと相互作用し、その結果金粒子同士が架橋することも考えられる。

【0009】タンパク質-金コンジュゲート同士の二次架橋もしばしば観察される。この二次架橋は、該コンジュゲートが既に安定化剤で飽和されている場合にも生成する。これはおそらく、従来の安定化剤を作用させても、疎水性パッチが金表面および/または吸着結合しているタンパク質に残存するため、タンパク質-金粒子が遅い速度で何の制御も受けずに凝集するという事実による。これらの問題は、金粒子を含むコンジュゲートで起こるだけでなく、他の固体(特に、他の金属)で作製された粒子でも起こる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、コロイド粒子と生体分子とのコンジュゲートを安定な形態にて提供することである。本発明によるコンジュゲートは、現段階の技術が抱える欠点を克服する。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するための本発明の第1の態様は、表面に生体分子を吸着させたコロイド粒子を含有する組成物であって、界面活性剤をさらに含有する上記組成物である。上記の組成物において、界面活性剤はエトキシレート界面活性剤であり得る。また、上記の組成物において、界面活性剤は0.0001~1mMの濃度であり得る。上記の組成物において、上記粒子は貴金属粒子であり得る。上記の組成物において、上記コロイド粒子の平均直徑は1nm~1000nmの範囲であり得る。上記の組成物において、上記生体分子は、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド核酸、サッカリド、抗原およびハプテンからなる群から選択され得る。

【0012】本発明のもう1つの態様は、上記のいずれかの組成物の製造方法であって、界面活性剤を、生体分子をローディングする前にコロイド粒子へ添加するか、および/または生体分子を含む溶液をコロイド粒子にローディングする前におよび/またはローディングする間に該生体分子を含む溶液へ添加する上記方法である。

【0013】本発明のさらにもう1つの態様は、検出試薬としての、上記のいずれかの組成物の使用である。本発明のさらにもう1つの態様は、コロイド粒子および生体分子より構成されるコンジュゲートを安定化させる方法であって、界面活性剤を、ローディング前にコロイド粒子へ添加するか、および/または生体分子を含む溶液をコロイド粒子にローディングする前におよび/またはローディングする間に該生体分子を含む溶液へ添加する上記方法である。上記の方法において、コンジュゲート形成の完了後に追加の安定化剤を添加し得る。

【0014】本発明のさらにもう1つの態様は、免疫学的検出法のための試験キットであって、上記のいずれかの安定化された組成物を検出試薬として含む上記キットである。

【0015】

【発明の実施の形態】驚くべきことに、界面活性剤が生体分子-粒子コンジュゲートを安定化させるのに非常に適していることが見出された。従って、本発明の主題の一つは、表面に生体分子を吸着させたコロイド粒子を含む組成物であって、界面活性剤をさらに含有する前記組成物である。

【0016】界面活性剤を、生体分子をローディングする前にコロイド粒子（例えば、金ゾル）へ添加することにより、および／またはコロイド粒子にローディングする前におよび／またはローディングしている間に生体分子を含む溶液へ添加することにより、粒子への生体分子の結合が、当業者が予測していたよりも遙かに少ない程度しか妨げられないことが見出された。このことはいくつかの点で驚くほど有利である。本発明に従って界面活性剤を添加することにより、既に従来の安定化剤ではコンジュゲート形成の前や再ローディングの前に発生してしまう凝集過程が防止される。これにより、コンジュゲートの製造過程の再現性が向上し、コンジュゲートの粒度分布がより均一になる（即ち、単分散性が増大する）。

【0017】現段階の技術の安定化剤に比べて、コンジュゲートの安定性が実質的に改善される。特に、既に安定化させた生体分子-粒子コンジュゲートがゆっくりと後凝集(after-aggregation)するのを抑制する（この後凝集は、従来の組成物を用いた場合に発生するものである）。これにより、長期安定性が向上し、溶液中での凝集傾向が低減し、周囲条件の変化に対する安定性が向上し、試験機能（例えば、クロマトグラフ特性）が向上する。界面活性剤の添加によって、試験時の生体分子-粒子コンジュゲートの機能（特に、生体分子-金コンジュゲートの機能）が非常に改善される。従って、例えば、試験時のブランク読みに相当する非特異的な結合が減少する。

【0018】前記改善が、例えば、生体分子の界面活性剤による置換によってまたは生体分子もしくはコロイド粒子と界面活性剤との可能な相互作用によってコンジュゲートの機能に負の影響を及ぼすことなく達成し得たのは、特に驚くべきことであった。

【0019】本発明の組成物は、水性懸濁液として存在することができ、また、例えば吸収紙（ろ紙）等のクロマトグラフ用の材料上に固定化することもできる。

【0020】上記粒子は、金属性の粒子または炭素粒子等の非金属性の粒子のいずれでもよい。金属性の粒子が好ましく、例えば、金属、金属酸化物、金属水酸化物、金属化合物の粒子または金属もしくは金属化合物で被覆

された粒子などが挙げられる。金属粒子が特に好適である。金属粒子は、好ましくは貴金属粒子（例えば、金、銀、銅、白金、パラジウムおよびこれらの混合物からなる群から選択される金属の粒子）である。金粒子が特に好適である。

【0021】粒子の平均直径は、現段階の技術では常のことであるが、1~1000nmの範囲であり、使用目的に応じて変えることができる。粒子の平均直径は、好ましくは2~200nmの範囲であり、特に好ましくは2~100nmの範囲である。

【0022】粒子の表面に吸着させる生体分子は、好ましくは、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド核酸(peptidic nucleic acid)、サッカリド、抗原およびハプテンからなる群から選択される。生体分子は、特に好ましくは、抗体、抗体断片、レクチン、酵素、ストレプトアビシン、アビシン、プロテインA、抗原、例えば、組換えポリペプチドまたは多重抗原(multiple antigen) (WO96/03652参照)、例えば、ポリハプテン（デキストランまたはタンパク質等の担体に結合した数種類のハプテンまたはペプチド）、ペプチドおよびハプテン（ビオチン、フルオレセインまたはジゴキシゲニン等の好ましくはMWが1500以下の低分子量物質）からなる群から選択される。これらの生体分子を金粒子へ吸着させるための厳密な条件については、上述のDe MeyおよびBeesleyの文献を参照されたい。

【0023】本発明によれば、使用可能な界面活性剤は、アニオン性、カチオン性、両性または非イオン性界面活性剤である。本発明の組成物は、界面活性剤として、好ましくはエトキシレート界面活性剤、特に好ましくはポリエトキシソルビタンラウレートおよび／またはポリエトキシソルビタンオレエートおよび／またはラウリルポリエチレングリコールエーテルを含有する。これらの界面活性剤はTWEEN（登録商標）およびBrij（登録商標）の商品名で市販されている（例えば、TWEEN80、TWEEN20、Brij35）。

【0024】界面活性剤は、好ましくは臨界ミセル濃度を超えない濃度で使用する。この点については、臨界ミセル濃度は、界面活性剤分子から高次凝集体(higer aggregate)（いわゆるミセル）が形成される濃度と理解されている。臨界ミセル濃度に到達したかどうかは、例えば表面張力、浸透圧、当量導電率、界面張力および／または密度等の物理的特性の急激な変化(jump)によって容易に決定することができる。これらのパラメーターの各々は、既知の方法で測定することができる。

【0025】最適な界面活性剤濃度は、吸着結合させる生体分子の各特性に依存し、各生体分子について個別に決定しなければならない。生体分子の適切量がコロイド粒子の表面に結合する一方で非特異的な疎水的相互作用が実質的に抑制される場合には、最適な界面活性剤濃度といえる。界面活性剤は、好ましくは0.0001~1mM、特

に好ましくは0.001~0.1mMの濃度である（コンジュゲート調製物中の最終濃度）。

【0026】本発明の組成物は、界面活性剤を、生体分子をローディングする前にコロイド粒子へ添加するか、および／または生体分子を含む溶液をコロイド粒子にローディングする前におよび／またはローディングしている間に該生体分子を含む溶液へ添加することにより調製することができる。

【0027】本発明の組成物は検出試薬として、特に免疫学的検出試薬として使用することができる。第一の好適な実施態様では、この検出試薬を免疫検定法〔即ち、標識されたアナライト類似体または標識されたアナライト特異的受容体（例えば、抗体）を用いる競合検定法、あるいは標識されたアナライト特異的受容体または該アナライト特異的受容体に結合可能な標識された別の受容体を用いるサンドイッチ検定法等の免疫学的方法によって試料液体中のアナライトを測定する方法〕で使用する。好適例は、妊娠テスト（例えば、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（HCG）を検出する試験）、またはコカインもしくはアンフェタミン等の薬物、ヒト血清アルブミン、トロポニンT、ミオグロビンおよび抗HIV抗体等の免疫グロブリンの検出法である。特に好適な適用形態は、定量すべき試料を、検出試薬を含有する吸着材料（例えば、試験片）に適用する迅速試験である。本発明の安定化された組成物を使用できる二番目に特に好適な実施態様は、組織切片の染色である。

【0028】さらに本発明の組成物は、生体分子-粒子コンジュゲートについて公知の他の全ての用途（例えば、遺伝子導入）にも勿論使用することができる。

【0029】さらに、本発明の別の主題は、コロイド粒子と生体分子とのコンジュゲートを安定化させる方法であって、界面活性剤を、ローディング前にコロイド粒子（特に、金ゾル）へ添加するか、および／または該生体分子を含む溶液をコロイド粒子へローディングする前および／またはその途中に該生体分子を含む溶液へ添加するものである。このようにして、コンジュゲートの長期安定性の増加、並びにpH安定性の向上および他の物質の存在に対する安定性の向上を達成することが可能となる。これらの適用では、界面活性剤は、好ましくは該ミセル濃度を超えない量で使用する。界面活性剤は、好ましくは最終濃度が0.0001~1 mM、好ましくは0.001~0.1 mMとなる量で使用する。

【0030】さらに、ローディング後に、不活性なタンパク質（例えば、ウシ・アルブミン）および／またはポリエチレングリコール等の当技術分野で公知の追加の安定化剤を使用することも可能である。

【0031】さらに、本発明は、本発明に従って安定化した組成物を検出試薬として含む免疫学的検出法のための試験キットにも関する。

【0032】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに説明する。

【実施例1（比較例）】

タンパク質-金コンジュゲートの調製：金粒子に吸着させるタンパク質の溶液は、好適なローディング用緩衝液で透析するか、もしくはローディング用緩衝液で希釈した。続いて、形成したであろう凝集体を、遠心分離または0.2 μmのフィルターで沪過することによって除去した。コロイド金粒子を含有する溶液のpHを、K₂CO₃を用いて該タンパク質の溶液のpHに調整した。次に、該タンパク質溶液を該コロイド金溶液に攪拌しながら添加した。この場合、タンパク質とコロイド金溶液との体積比は1:10であった。

【0033】このようにして調製したタンパク質-金コンジュゲートを、現段階の技術に従い、BSA（ウシ血清アルブミン）溶液を最終濃度0.01%~3%（w/v）まで添加するか、もしくはポリエチレングリコール溶液を最終濃度0.01%~0.1%（w/v）まで添加することによって安定化した。続いて、このタンパク質-金コンジュゲートを精製し、濃縮して、所望の保存緩衝液条件（例えば20 mM Tris、100 mM NaCl pH 8、1% BSAおよび／または0.01%~0.1% PEG、NaN₃）に設定した。

【0034】【実施例2】

PAB<ジゴキシン>S-IgG (IS)（説明：ヒツジ由来のポリクローナル抗ジゴキシン抗体、免疫吸着IgG調製物）と20 nm金ゾルとのコンジュゲート形成における界面活性剤の添加時間の影響：

【0035】疎水性抗体PAB<ジゴキシン>S-IgG (IS)と粒径20 nmの金ゾルとのコンジュゲートを形成させた。このコンジュゲート形成は、pH 8.5の溶液中で行った。M 843と呼ばれる金ゾルを出発物質として用い、上記疎水性抗体を最終濃度5 μg/mlで添加して、タンパク質-金コンジュゲートを形成した。これに関して、実験調製物2aとは、界面活性剤を添加せずに、現段階の技術に従って調製したコンジュゲートである。0.04 mM Brij 35を実験調製物2b~2eに種々の時間において添加した。550 nmと600 nmにおけるODの各々の比率を表1に示す。この値は、粒度分布の均一性のパラメーターである。この値が低い程、凝集体の比率は高く、コンジュゲート粒子の粒度分布はより不均質である。したがって、可能な限り高いOD 550/600値を有することが望ましい。表1には、さらに、光子相関分光法（photon correlation spectroscopy）（PCSと呼ぶ）により測定したコンジュゲート粒子の平均直径を示してある。コンジュゲート粒子の直径、したがってPCSの値は可能な限り低いものでなければならない。

【0036】一般に、手順としては、まず最初に、ローディングされていない金ゾルをIgGと混合して、生体分子-金コンジュゲートを形成した。IgG溶液を金ゾルに添加した後、該コンジュゲートに安定化剤としてのBSA

を再ローディングした。実験調製物2bでは、界面活性剤は、IgG (IgG溶液は金ゾルに添加する際に、1:10に希釈した)を添加する前に金溶液に添加した。実験調製物2cでは、界面活性剤はIgG溶液に添加した。実験調製物2dでは、界面活性剤は、IgG溶液を金ゾルに添加した直後

であるがBSAを再ローディングする前に添加した。実験調製物2eでは、界面活性剤は、BSAによる再処理が完了した後で添加した。

【0037】

【表1】

PAB<ジゴキシン>S-IgG (IS:07) - 金コンジュゲート				
実験調製物	IgG濃度 [μg/ml]	OD 550/600	PCS [nm]	備考
M843	—	3.94	21.5±3.7	金ゾル
2a	5	3.87	107±42	(比較例)
2b	5	4.08	65±33	=2a, ただし、 IgG の前に0.04mM Brij 35を添加
2c	5	4.06	58±30	=2a, ただし、 IgG溶液中に 0.4 mM Brij 35 を添加
2d	5	3.9	100±46	=2a, ただし、 IgGの後で0.04 mM Brij 35を添加
2e	5	3.8	94±46	=2a, ただし、 BSAの後で0.04m MBrij 35を添加

【0038】表1からもわかるように、実験調製物2bおよび2cは最も好ましい特性を有する。得られたコンジュゲートは、現段階の技術と比較して、非常に改善された直径および高いOD 550/600値(すなわち、比較的均一な粒度分布)を有する。したがって、疎水力に基づくPAB-PAB、金-金および非特異的PAB-金の相互作用は、金ゾルをローディングする前および/またはローディングしている間に界面活性剤を添加することによって、最も良く抑制される。

【0039】[実施例3]

組換えHIV抗原p24と40nm金ゾルとのコンジュゲート形成における界面活性剤の添加時間の影響：平均粒径が40nmの金ゾル(M825)に、5 μg/mlの濃度で組換えHIV抗原p

24をローディングした。該溶液のpHは、いずれの場合も8.0に調整した。手順は、実施例2に記載したものと同様であった。抗原p24を金ゾルに添加することによって、p24-金コンジュゲートが形成された。続いて、BSAを安定化剤として添加することにより再ローディングを行った。実験調製物3bでは、p24を添加する前に、0.04mMのBrij 35を金ゾルにさらに添加した。実験調製物3cでは、0.4mMのBrij 35をp24溶液に添加した(このp24溶液は、続いて行われる金ゾルへの添加の際に1:10に希釈した)。実験調製物3dでは、BSAの再ローディングが完了した後で、0.04mMのBrij 35を添加した。

【0040】

【表2】

p24(02) - 金コンジュゲート				
実験調製物	備考	収率 [%]	OD 550/600	PCS [nm]
M825	金ゾル	100	2.41	43±24
3a	(比較例)	78	2.06	83±45
3b	=3a、但し、p24添加前に0.04mM Brij 35を添加	93	2.12	63±36
3c	=3a、但し、p24溶液中に0.4mM Brij 35を添加	92	2.13	63±35
3d	=3a、但し、BSA添加後に0.04mM Brij 35を添加	85	2.01	67±24

【0041】この場合も、Brij 35が添加されていない

実験調製物3aと比較して、パラメーターOD 550/600お

よりPCSの大きな改善が見られた。

【0042】[実施例4]

MAB<PSA>M-10-IgG（マウス・モノクローナル抗PSA抗体No.10、IgG調製物）と20nm金ゾルとのコンジュゲート形成における種々の界面活性剤濃度の添加の影響：MAB<PSA>M-10-IgGを20nmの金ゾルに添加することにより、MAB<PSA>M-10-IgG-金コンジュゲートを形成した。界面活性剤は、下記の濃度でMAB<PSA>M-10-IgG溶

液に添加した。結果を表3に示す。

MAB<PSA>M-10-IgGでは、Brijの最終濃度は0.005～0.01mMが最適であることが判明した。全体的に、あまり疎水性でないタンパク質の場合よりも、疎水性が高いタンパク質の場合では、より高い界面活性剤濃度が必要であることがわかった。

【0043】

【表3】

実験 調製物	MAB<PSA>M-10-IgG-金 (20nm金ゾルから) ローディング混合物中のBrij 35の濃度の最適化					
	添加IgG (μ g/ml)	Brij35 (mM)	上清中のIgG (添加IgG の%)	OD 500/600による直徑 (nm)	PCS (nm)	備考
				OD 500/600による直徑 (nm)		
4a	2	0	0.1	2.60	57	現段階の技術、試験片において不適当
4b	2	0.005	3	3.53	32	試験片において適当
4c	2	0.01	6	3.57	30	試験片において適当
4d	4	0.005	9	3.42	30	試験片において適当

【0044】[実施例5]

コンジュゲートの安定性：本発明に従って調製した金コンジュゲートの安定性を、従来の方法により調製した金コンジュゲートと比較して調べた。2種の調製物では、同じ手順により、いずれの場合も同じMAB<HCG>-IgGおよび40nm金ゾルを出発物質として用いて、MAB<HCG>IgG-金コンジュゲートを調製した。調製物5aでは、界面活性剤を添加せずに、タンパク質溶液を金ゾルに添加することによって調製を行った。調製物5bでは、金ゾルにローディングするのに用いたIgG溶液は0.1mM Brij 35を含有していた。それぞれの場合において、コンジュゲートを調製した直後に（すなわち、安定化剤としてBSA

を添加した後）、そして27週間までの一定の時間間隔で4°Cにて保存した後に、特徴的なパラメーターであるOD 550/600および直徑PCSを調べた。調製物5aでは、保存の間に粒径は非常に増大し、OD 550/600の値は減少した。一方、本発明による調製物5bでは、それら両方のパラメーターは、わずかに変化しただけであった。このことから、本発明によるタンパク質-金コンジュゲートは、現段階の技術によるタンパク質-金コンジュゲートよりも非常に安定なことがわかる。

【0045】

【表4】

調製物	MAB<HCG>-IgG-金 (40nm金ゾルから) 長期保存 (+4°C) における金コンジュゲートの安定性の試験					
	IgG溶液中の Brij 35(mM)	OD 550/600 調製直後	PCSによる直徑(nm)			
			+4°Cで27週後 調製直後	+4°Cで27週後 調製直後	+4°Cで27週後 調製直後	+4°Cで27週後 調製直後
5a	0	2.35	1.92	61	105	
5b	0.1	2.37	2.26	58	62	

【0046】[実施例6]

トロポニン試験片における金コンジュゲートの使用：MA B<トロポニンT>M-11-7-IgGと40nm金ゾルとから成る一連のコンジュゲートを、Trop T試験片におけるそれらの機能について比較した。調製物6aおよび調製物6b～6gにおいて調製したコンジュゲートは、主に、調製物6aで

は、界面活性剤を用いずにローディングを行ったが、調製物6b～6gでは0.075mM Brij 35を含むIgG溶液を用いた点において異なるものであった。

【0047】表5の最後の欄からもわかるように、従来の方法により調製した金コンジュゲートを用いた試験片では非特異的なブランクが生じ、それは非常に高いもの

であったので、この場合には、このコンジュゲートは用いることができない。これに対して、Brijの存在下で被覆された本発明によるコンジュゲートは、ブランクを全く生じなかつたか、もしくはわずかなブランクを生じた

だけであり、したがつて、試験片として好適であった。

【0048】

【表5】

MAB<TN-T>M-11-7-IgG-金コンジュゲート

調製物	PCS サイズ [nm]	OD 550/600	試験片の評価 (ブランク= 非特異的結合 /ブランク)	試験片の評価 (カットオフ)	試験片好適性
-----	-----------------	---------------	-----------------------------------	-------------------	--------

6a	54	2.26	強いブランク	測定不能	ブランク のため不合格
6b	54	2.26	僅かな ブランク (20分後)	0.05ng/ml	合格
6c	50	2.17	殆ど ブランクなし (20分後)	0.05ng/ml	合格
6d	57	2.31	僅かな ブランク (30分後)	0.05ng/ml	合格
6e	51	2.11	僅かな ブランク (30分後)	0.05ng/ml	合格
6f	56	2.31	ブランクなし	0.05ng/ml	合格
6g	52	2.27	ブランクなし	0.05ng/ml	合格

【0049】

【発明の効果】上記したように、本発明による生体分子-金コンジュゲートは、界面活性剤を含有させることに

より、凝集体の形成が低減し、安定な形態で提供される。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/543
33/553
// C 0 7 K 103:00

識別記号
525

F I
G 0 1 N 33/543
33/553
5 2 5 W